# 1 Einleitung und Problemstellung

Der Einsatz biotechnologischer Verfahren zur gezielten Herstellung von Produkten gewinnt gegenüber der chemischen Synthese zunehmend an Bedeutung. Nach der so genannten roten und grünen Biotechnologie beginnt sich die dritte Welle auszubreiten, die Weiße bzw. Industrielle Biotechnologie [1]. Aufgrund des wachsenden Bedarfs an Substanzen, welche auf chemischen Wege nur schwer oder zu kostenintensiv zu synthetisieren sind, werden durch die technische Nutzung spezifischer Reaktionen nativer oder gentechnisch veränderter Zellen sowie deren Bestandteilen eine Vielzahl von Produkten synthetisiert. Bereits heute haben biotechnologisch hergestellte Produkte einen Anteil am weltweiten Umsatz der Chemischen Industrie von 5 %. Die intensivste Anwendung findet die Biotechnologie derzeit bei Fein- und Spezialchemikalien. Bei der Herstellung von Spezialchemikalien macht der Einsatz von Enzymen einen Umsatzanteil von 2 Milliarden US$ aus [1].

Seit etwa 100 Jahren haben sich Enzyme tierischer, pflanzlicher und mikrobieller Herkunft zu bedeutenden technischen und analytischen Hilfsreagenzien entwickelt. Seit etwa 1970 werden immobilisierte Enzyme mit zunehmender Tendenz als Biokatalysatoren für chemische Umsetzungen verwendet (Enzymtransformation). Die Möglichkeit, gentechnisch veränderte Proteine industriell herzustellen, hat zu einem weiteren Aufschwung der Enzymtechnologie geführt. Die Entwicklung neuer bzw. die Weiterentwicklung bereits vorhandener enzymatischer Verfahren erfordert eine interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen (Bio-)Chemikern, Mikrobiologen und Verfahrenstechnikern. Der Verfahrenstechniker muss dabei die Erkenntnisse zur Kinetik der enzymkatalysierten Reaktion und die Materialeigenschaften des eingesetzten freien oder immobilisierten Enzyms bei der Übertragung der Verfahren in den Produktionsmaßstab umsetzen. An dieser Stelle setzt die vorliegende Arbeit an.

Kohlenhydrate stellen in Form der pflanzlichen Zellulosen und Lignine die in der Natur massenmäßig am weitesten verbreiteten Polymerstoffe dar. Doch während die beiden anderen Gruppen polymerer Biomoleküle, die Nukleinsäuren und die Proteine, schon seit Jahrzehnten auf den ersten Plätzen innovativer Entwicklungen stehen, fristeten die Kohlenhydrate bis auf wenige Ausnahmen bislang ein Schattendasein. Vor allem in der Pharmaindustrie erwartet man von zuckerbestückten Proteinen und Lipiden eine Erweiterung der Produktpalette.

Bereits heute sind mehr als dreißig Arzneimittel mit Polysaccharidanteil als Medikament zugelassen oder befinden sich in der klinischen Prüfung.

Oligosaccharide und speziell Isomaltooligosaccharide stellen aufgrund ihrer prebiotischen Eigenschaften interessante Zielprodukte in der Pharmazeutischen-, Lebensmittel- und Kosmetikindustrie dar [2]. Das Disaccharid Isomaltose ist bisher technisch nur im Gemisch, nicht aber isoliert zugänglich. Isomaltose kann durch den Transfer einer Glucosyleinheit mittels des Enzyms Dextransucrase aus *Leuconostoc mesenteroides NRRL B-512-F* von Saccharose (Substrat) auf Glucose (Akzeptor) gewonnen werden. Das Produkt, die Isomaltose, ist aber selbst auch Akzeptor der enzymatisch katalysierten Reaktion, kann zu höheren Oligosacchariden weiterreagieren und muss somit schnell aus dem Reaktionsraum ausgeschleust werden.

Untersuchungen zur Kohlenhydratadsorption [3] haben gezeigt, dass sich bei geeigneter Wahl des Adsorbermaterials die Isomaltose bei bestimmten Bedingungen „selektiv“ aus Kohlenhydratgemischen abtrennen lässt.

Es war Ziel dieser Arbeit, den Prozess aus enzymatischer Produktion von Isomaltose durch Einsatz eines immobilisierten Biokatalysators in einer Wirbelschicht und gleichzeitig überlagerter Adsorption zu etablieren. Dazu wurde, aufbauend auf Ergebnissen bekannter und eigener Laboruntersuchungen, eine Versuchsanlage im (halb)technischen Maßstab aufgebaut und der Prozess experimentell und theoretisch untersucht. Mit einem Reaktionsmodell, bestehend aus Hydrodynamik, Reaktionskinetik des Enzyms und Thermodynamik der Adsorption, erfolgt ein Vergleich von berechneten und experimentellen Daten.

Über einen kontinuierlich arbeitenden Bioreaktor mit integrierter Produktabtrennung mittels suspendiertem Adsorbens bei gleichzeitig anwesenden immobilisierten Enzymen sind keine Publikationen bekannt.

# 2 Stand des Wissens

## 2.1 Enzyme und Biokatalysatoren

Was sind Enzyme? Diese Frage wurde noch kontrovers diskutiert, als ihre Wirkung auch außerhalb lebender Systeme bereits klar erkannt war und erste industrielle Anwendungen bereits eingesetzt hatten. Mit ihnen katalysieren und steuern Mikroorganismen, Pflanzen und Tiere ihre lebensnotwendigen Stoffumwandlungen schnell, selektiv und effektiv [4]. Chemisch gehören Enzyme zu den Proteinen (hochmolekulare Polypeptide), lässt man außer Acht, dass auch bestimmte mRNA-Moleküle eine katalytische Aktivität entfalten können [5]. Mehr als 3000 Enzyme sind mit den Methoden der Proteinchemie in reiner, z.T. kristallisierter Form dargestellt worden. Man gewinnt sie heute zu etwa 60 % aus pflanzlichen oder tierischen Materialien und zu etwa 40 % auf fermentativem Wege aus Mikroorganismen [6]. Enzyme sind Naturstoffe und können deshalb in allen Bereichen außer in Lebensmitteln und in der Humantherapie frei verwendet werden, sofern sie nach GMP-Methoden (good manufacturing practice) hergestellt wurden. Nach den von ihnen katalysierten Reaktionstypen teilt man die Enzyme in 6 Hauptklassen nach IUAPAC ein (Tab. 2.1).

Tab. 2.1: Einteilung der Enzymklassen

| Enzymklasse | Katalysierte Reaktion |
|---|---|
| Oxidoreduktase | Oxidations- und Reduktionsreaktion |
| Transferasen | Übertragung von Gruppen zwischen Molekülen |
| Hydrolasen | Hydrolytische Reaktionen |
| Lyasen | Abspaltung von Gruppen unter Bildung einer Doppelbrücke |
| Isomerasen | Isomerisierungsreaktionen |
| Ligasen | Kovalente Verknüpfung zweier Moleküle |

Für chemische Synthesen können Enzyme Vorteile aufweisen. Sie wirken im Gegensatz zu chemischen Katalysatoren in mehrfacher Hinsicht hochspezifisch. Sie besitzen eine ausgesprochene Substratspezifität, während auch strukturell sehr nah verwandte Moleküle meist nicht umgesetzt werden. Sie wirken stereospezifisch, d.h. sie setzten z.B. nur eines von mehreren Enantiomeren um (Schlüssel-Schloß-Prinzip).

Einige grundlegende Eigenschaften von Enzymen seien hier zusammengefasst:

- Jede enzymatische Reaktion beginnt mit einer reversiblen Bindung des Substrats
- Enzyme können nicht die Richtung einer chemischen Reaktion beeinflussen. Sie beschleunigen nur die Einstellung von Gleichgewichten
- Enzyme gehen wie andere Katalysatoren unverändert aus einer Reaktion hervor
- Enzyme können im Gegensatz zu einfachen, chemischen Katalysatoren in ihrer Aktivität reguliert werden

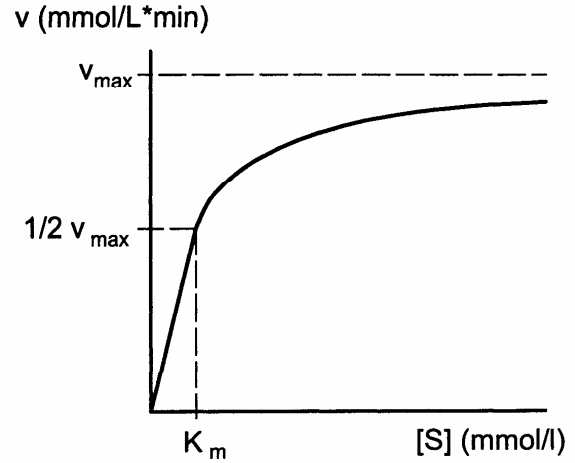
Für derartige Aufgaben werden meist Enzyme verwendet, die keine externen Cofaktoren benötigen [7]. Viele Enzyme liegen heute in klonierter Form vor und können durch Protein Engineering für industrielle oder andere Anforderungen optimiert werden.

### 2.1.1 Kinetische Charakterisierung enzymkatalysierter Reaktionen

Aufgabe der Enzymkinetik ist die quantitative Beschreibung der Umsatzraten der Reaktionspartner einer enzymatischen Reaktion in Abhängigkeit von den Prozessparametern (Konzentration, Temperatur, pH-Wert usw.).

#### 2.1.1.1 Bestimmung substratspezifischer Parameter

Typisch für enzymkatalysierte Reaktionen ist, jedoch keineswegs allgemeingültig, dass die Umsatzgeschwindigkeit von der Konzentration an Substrat abhängt. Bei niedrigen Konzentrationen nimmt sie mit der Substratkonzentration zu, bei hohen Substratkonzentrationen wird sie unabhängig von der Substratkonzentration. 1913 schlugen *Michaelis* und *Menten* ein einfaches kinetisches Modell vor (Gl.2.1):




Michaelis-Menten:

$$v_0 = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \qquad \text{Gl. 2.1}$$

Abb. 2.1: Geschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion als Funktion des Substratgehalts

Abb. 2.1 zeigt eine grafische Darstellung dieser Relation. Man erkennt, dass für kleine Substratkonzentrationen die Umsatzrate linear (Reaktion 1. Ordnung) ist. Bei hohen Substratkonzentrationen nähert sich die Rate einem Maximalwert (Reaktion 0. Ordnung). Die *Michaelis-Menten*-Konstate $K_M$ entspricht dann der Substratkonzentration, bei der die Umsatzrate v halb so groß ist wie die maximale Umsatzrate $v_{max}$. Die maximale Umsatzrate wird erreicht, wenn alle aktiven Zentren des Enzyms mit Substrat besetzt sind.

Liegen zuverlässige Werte für die Umsatzraten $v_0$ zu Beginn der Reaktion bei verschiedenen Substratkonzentrationen vor, so können $v_{max}$ und $K_M$ leicht näherungsweise graphisch ermittelt werden. Dies gelingt auf verschiedene Weisen, bekannt sind z.B. Darstellungen nach:

Lineweaver-Burk:
$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_M}{v_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \qquad \text{Gl. 2.2}$$

Hanes:
$$\frac{[S]}{v_0} = \frac{K_M}{v_{max}} + \frac{[S]}{v_{max}} \qquad \text{Gl. 2.3}$$

Eadie-Hofstee:
$$v_0 = v_{max} - K_M \cdot \frac{v_0}{[S]} \qquad \text{Gl. 2.4}$$

Die grafische Darstellung dieser Zusammenhänge ist im Anhang (Abb. 12.1) zu finden.

#### 2.1.1.2 Beeinflussung der Enzymkinetik durch verschiedene Faktoren

In Kapitel 2.1.1 sind die grundlegenden quantitativen Beziehungen der „ungestörten“ Enzymkinetik dargestellt. Das aktive Zentrum des Enzyms kann direkt oder indirekt durch Veränderungen der physikalischen Umweltfaktoren (z.B. pH-Wert und Temperatur) oder durch andere Stoffe beeinflusst und dadurch die Geschwindigkeit der enzymkatalysierten Reaktion gesteigert (Aktivierung) oder gesenkt (Hemmung, Inhibierung) werden [8].

**Inhibierungsmechanismen**

Viele Verbindungen können die Aktivität eines Enzyms herabsetzen, indem sie die Bildung oder den Zerfall des Enzyms-Substrat-Komplexes behindern. Einfache Modellvorstellungen

für die wichtigsten Inhibierungsmechanismen sind die Substratinhibierung, die Kompetetive Inhibierung, die Produktinhibierung und die Nicht-Kompetetive Inhibierung.

Zum Beispiel kann es mit steigender Substratkonzentration zu inhibierenden Effekten durch das Substrat und damit zu Abweichungen von der *Michaelis-Menten*-Kinetik kommen. Dabei führt die Bindung eines zweiten Substratmoleküls zur Ausbildung eines inaktiven Komplexes [9], so dass eine unkompetitive Hemmung resultiert. Unter Berücksichtigung des Substrateinflusses muss die Geschwindigkeitsgleichung um den Ausdruck einer entsprechenden Hemmkonstante $K_{SI}$ erweitert werden.

$$v_0 = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S] + \frac{[S]^2}{K_{SI}}} \qquad \text{Gl. 2.5}$$

Analog zur linearisierten Darstellung der Substratkinetik kann nach *Dixon* die Hemmkonstante $K_{SI}$ durch die Auftragung $1/v_0$ gegen [S] aus dem Abszissenschnittpunkt ermittelt werden.

$$\frac{1}{v_0} = \frac{1}{v_{max} \cdot K_{SI}} \cdot [S] + \frac{1}{v_{max}} \qquad \text{Gl. 2.6}$$

**Einfluss des pH-Wertes**

Enzyme enthalten mehrere saure und basische Aminosäurereste. Diese ändern ihren Ionisationszustand, wenn der pH-Wert verändert wird. Die katalytische Aktivität wird maßgeblich durch die ionisierenden Gruppen der Aminosäuren eines Enzyms geprägt. Die pH-Abhängigkeit bezieht sich zum einen direkt auf einen Ladungswechsel essenzieller Aminosäure-Seitenketten im aktiven Zentrum, zum anderen wird die dreidimensionale Proteinstruktur durch elektrostatische Wechselwirkungen dieser Seitenketten stabilisiert, so dass Konformationsänderungen indirekt die Katalyse beeinflussen. Trägt man die messbare Aktivität gegen den pH-Wert auf, so findet man ein Optimum.

**Einfluss der Temperatur**

Ein ähnliches Bild ergibt sich bei der Temperatur. Die Aktivierung steigt mit der Temperatur, bis Denaturierungsprozesse die Funktion des Proteins stören und schließlich ausschalten [5]. Im Allgemeinen ändert sich die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit nach der *Arrhenius*gleichung (1889) exponentiell mit der Temperatur, sofern die Enzymaktivität durch den Einfluss thermischer Denaturierung nicht eingeschränkt wird. Die Abnahme der Enzymaktivität bzw. Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Temperatur als Funktion der Zeit kann folgendermaßen beschrieben werden.

$$E = E_0 \cdot e^{(-k_d \cdot t)} \qquad \text{Gl. 2.7}$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} \qquad \text{Gl. 2.8}$$

Die Enzymstabilität ist für die effiziente Produktausbeute im technischen Maßstab von entscheidender Bedeutung. Durch Zusatz von Stabilisatoren, chemischen Modifikationen, Immobilisierung oder entsprechendes „protein engineering“ lässt sich in vielen Fällen eine Steigerung der Stabilität erzielen [10].

### 2.1.2 Die Glucosyltransferase Dextransucrase

Das Enzym Dextransucrase wird extrazellulär von zur Zeit mehr als 100 bekannten Stämmen der Gattungen *Leuconostoc*, *Streptococcus* und *Lactobacillus* [11, 12] produziert.

Zu den Dextransucrasen werden allgemein jene Enzyme gezählt, deren primäre katalytische Wirkungsweise in der Umwandlung von Saccharose in das Polysaccharid Dextran und Fructose besteht. Dextran ist ein Polyglucan, dessen Hauptkette sich ausschließlich aus α-1,6-glucosidisch verknüpften Glucoseeinheiten zusammensetzt. Mindestens 50 % der glucosidischen Bindungen im Dextranmolekül müssen dieser Natur sein. Außerdem besitzen Dextrane immer auch α-1,2-, α-1,3- und /oder α-1,4-gebundene Seitenketten.

Die Reaktionsgleichung der Dextransucrase-katalysierten Saccharoseumwandlung kann schematisch wie folgt wiedergegeben werden:

$$\text{n Saccharose} \xrightarrow{\text{Dextransucrase}} (0\text{-}\alpha\text{-}1,6\text{-Glucosyl-})_n + \text{n Fructose} \qquad \text{Gl. 2.9}$$

Da in jedem einzelnen Reaktionsschritt eine Glucoseeinheit aus dem Substrat Saccharose auf die wachsenden Dextranketten übertragen wird, sind Dextransucrasen demnach der Klasse der Transferasen zugeordnet, und die Bezeichnung entsprechend der IUPAC-Nomenklatur lautet [13]:

1,6-α-D-glucan-6-α.D-glucosyltransferase (EC 2.4.1.5.).

Das von *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512 F-DS gebildete Dextran ist nur zu 5 % verzweigt und daher sehr gut in Wasser löslich. Aus diesem Grund wird ausschließlich dieser Stamm zur industriellen Dextranherstellung benutzt [14]. Diese kommerziell bedeutsamen Dextrane kommen insbesondere in der Medizin (Blutplasmaexpander) und in der Labortechnik (präparative Gel-Chromatographie, Handelsname Sephadex) zum Einsatz. Für kinetische und mechanistische Untersuchungen eignet sich diese Dextransucrase gut, da sich aufwendige Verfahren zur Erfassung von zahlreichen Nebenprodukten weitgehend erübrigen.

Abgesehen von der Substratreaktion vermag die Dextransucrase unter anderem noch eine weitere Reaktion zu katalysieren, wenn geeignete zusätzliche Substanzen, so genannte Akzeptoren, im Reaktionsgemisch vorhanden sind. In Gegenwart dieser Akzeptoren (z.B. Mono- und Oligosaccharide) bilden sie Oligosaccharide, die um einen oder mehrere Glucosereste mit α-1,6-glycosidischer Bindung verlängert sind.

$$\text{n Saccharose} + \text{Akzeptor} \xrightarrow{\text{Dextransucrase}} (\text{Glucosyl-})_n + \text{n Fructose} \qquad \text{Gl. 2.10}$$

bzw.

$$\text{n F-G} \quad + \quad \text{A} \xrightarrow{\text{Dextransucrase}} \text{A-G}_n \quad + \text{n Fructose}$$

Wie bereits aus den Reaktionsgleichungen hervorgeht, ist die Gegenwart von Saccharose – oder zumindest einem der anderen wenigen Substrate für Dextransucrase – zwingende Vorraussetzung dafür, dass eine Akzeptorreaktion überhaupt stattfinden kann. Im Gegensatz zur Substratreaktion zeigt die Akzeptorreaktion keine besonders hohe Spezifität. Akzeptoreigenschaften konnten inzwischen für eine Vielzahl verschiedener Saccharide und Saccharidderivate wie z.B. Fructose, Maltose, Isomaltose oder KGPA [15-19] nachgewiesen